Studien zur Frage der Organveränderungen, der blutchemischen Befunde und des peripheren Blutbildes nach Langzeitverabreichung des Netzmittels Triton

Vorgelegt von
Wolfgang Schulze
aus Erlangen

1962

1964 № 58

Aus der Medizinischen Universitätsklinik Erlangen
Direktor: Prof. Dr. med. N. Henning

Studien zur Frage der Organveränderungen, der blutchemischen Befunde und des peripheren Blutbildes nach Langzeitverabreichung des Netzmittels Triton

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen - Nürnberg

Vorgelegt von
Wolfgang Schulze
aus Erlangen

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät
der Universität Erlangen - Nürnberg

Dekan: Prof. Dr. A. Windorfer
Referent: Prof. Dr. N. Henning

Tag der mündlichen Prüfung: 26. 11. 1962

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK - LEIDEN -

Einleitung.

Netzmittel vom Typ eines polymeren p-Isooktylpolyoxyäthylens (Triton) erzeugen bekanntlich (2,5,8,9,11,13,14,17,24,25,28, 33,35,36,37,39) bereits nach einmaliger Applikation einer genügend hohen Dosis eine über Tage anhaltende Hyperlipämie. Diese unterscheidet sich von der, die man bei Cholesterinfütterung, Hypothyreodismus, essentieller Xanthomatose oder Nephrose findet, dadurch dass an ihr alle Komponenten des Serumfettes (Neutralfett, Cholesterin und Phosphatide) beteiligt sind. Die Tatsache, dass die Hyperlipämie nach einmaliger Applikation von Triton über 5-15 Tage fortbestehen kann, legt die Annahme nahe, dass der Körper keine Stoffe besitzt, die das Triton abbauen können.

Untersuchungen an künstlich erzeugter Hyperlipämie hatten bislang zum Ziel, Transport und weiteres Schicksal der in das Blut eingeschleusten Fettsubstanzen zu studieren, wobei in besonderem Masse die Ablagerung solcher Lipide in verschiedenen Organen beobachtet wurde (2,24,25). Wie bereits aus grundlegenden Studien hervorgeht (35), konnte unter Berücksichtigung des zeitlichen Ablaufs ein Anstieg des Gesamtfett-Gehaltes schon 8 Stunden nach Verabreichung von Triton und zwar zunächst nur i.S. einer Vermehrung des Neutralfettes festgestellt werden; erst nach 24-32 Stunden folgte der Anteil der Lipoide (Cholesterin und Phosphatide); in der abklingenden Phase hinwiederum sank zunächst der Neutralfettgehalt und dann erst der Gehalt an Lipoiden.

Da die meisten Arbeiten über das Gebiet der Netzmittel mehr oder weniger kurzfristige Verlaufsuntersuchungen darstellen, sollte in vorliegender Arbeit geprüft werden, inwieweit eine langdauernde Hyperlipämie zu manifesten Läsionen an den verschiedenen Organen, hier insbesondere an Leber, Niere und Gefässapparat verursacht und somit also auch funktionelle Störungen der etwa so geschädigten Organe nach sich zieht. Es wurden dabei als Maßstab einer Organfunktionsstörung Serumlabilitätsteste, Rest-N und Serumelektrophorese fortlaufend kontrolliert, darüberhinaus auch das periphere Blutbild untersucht, hier mit der Frage nach einer etwa auftretenden Anämie und nach Entzündungsreaktionen. Die Versuchsanordnung wurde so gewählt, dass unter einer relativ milde dosierten Dauerapplikation eines Netzmittels einerseits eine ausreichende Hyperlipämie, andererseits jedoch keine direkte toxische Wirkung durch das injezierte Präparat zu erwarten war.

Untersuchungsgut und Versuchsanordnung.

Es wurden 5 Kaninchen mit einem durchschnittlichen Gewicht von 3000 - 4000 g in Versuch genommen. Vor Versuchsbeginn wurden bei jedem Tier die Ausgangswerte A für die verschiedenen Serumuntersuchungen (s.u.) festgestellt. Die Tiere wurden cholesterinfrei ernährt. Die Versuchsanordnung im engeren Sinne bestand darin, dass 2x wöchentlich 0,5 ml einer 50 %igen Tritonlösung pro Injektion und Tier i.V. appliziert wurden, dies insgesamt über 24 Wochen. Kontrollen K erfolgten in 4-wöchentlichen Abständen (s. Abb. 1).
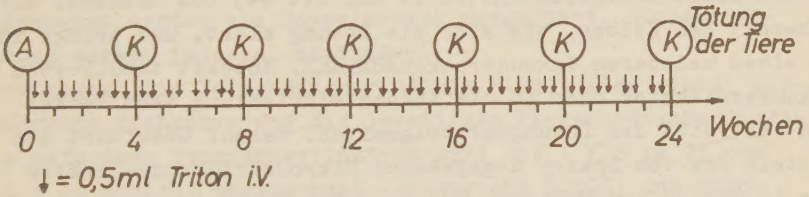
Abb. 1. Versuchsanordnung.

Im einzelnen wurde folgendes untersucht: Ges.-Fett, Gesamt-Cholesterin, Cholesterinester, freies Cholesterin, Ges.-EW, Leberfunktionsproben, Phosphatide, Rest-N, Serumelektrophorese mit Protein-, Lipoproteid- und KH-Färbung sowie peripheres Blutbild. Außerdem wurden der Gesamtzustand und das Gewicht der Kaninchen jedesmal beurteilt. Schließlich wurde nach Abschluß der Versuchs- und Beobachtungszeit die histologische Untersuchung einzelner Organe, wie Leber, Herz, Niere, Milz und Lunge vorgenommen.

Untersuchungsmethoden.

Gesamtfett-Bestimmung im Serum (16).
1 ccm Serum wird unter Schütteln in einen 25-ccm-Messkolben pipettiert, in dem sich 8,3 ccm Methanol befinden. Anschliessend werden 8,3 ccm Chloroform dazupipettiert und der Kolben im Wasserbad unter leichtem Umschwenken bis zum Sieden erhitzt.

Nach dem Abkühlen wird bis zur Marke mit Chloroform aufgefüllt und durch ein zuvor mit Chloroform-Methanol-Mischung 2:1 extrahiertes Faltenfilter (Schleicher und Schüll Nr. 588) filtriert. 20 ccm des Filtrates werden in einen 40-50 ccm fassenden Weithals-Erlenmeyer-Kolben gegeben und vorsichtig mit Leitungswasser überschichtet, bis der Kolben angefüllt ist. Dann stellt man den Kolben über Nacht in ein 1 l fassendes Glasgefäss voll Wasser (muß untertauchen). Auf diese Weise werden die Nicht-Fett-Substanzen durch Diffusions- und Konvektionsströme entfernt. Am nächsten Morgen saugt man das überstehende Wasser vorsichtig ab, wobei ein Aufwirbeln der an der Phasengrenze entstandenen weisslichen Trübungszone vermieden werden muss. Anschliessend füllt man mit 8-9 ccm Methanol auf, schwenkt den Kolben, bis sich die Lösung klärt, und bringt ihn in einen heizbaren Vakuumtrockenschrank, doppelt tubulierten Vakuumexsikkator oder in die Abdampfeinrichtung nach Heckel und vertreibt das Lösungsmittelgemisch. Darauf überführt man mittels des von Sperry angegebenen Mikroüberführungsgerätes die in Chloroform/Methanol 2:1 gelösten Fette in einen vorgewogenen 5-ccm-Messkolben durch 3maliges Umspülen mit je 1 ccm Chloroform-Methanolmischung und wägt nach neuerlichem Abdampfen des Lösungsmittels aus.
Berechnung: Auswaage in mg x 125 = mg% Gesamtfett.

Phosphatidbestimmung (16).
Etwa 2-4 mg Serumfett werden in einen Veraschungskolben (Kjeldahl) überführt. (Das nach obiger Methode gewonnene Gesamtfett wird nach dem Wägen mit Methanol/Chloroform 2:1 aufgefüllt und ein aliquoter Teil -2 ccm etwa- überführt). Nach Zugabe einer Glasperle wird das Lösungsmittel restlos abgedampft (Rückstände des Alkohols geben bei der Veraschung zu Explosionen Anlass). Es wird 1 ccm Salpetersäure- Schwefelsäuremischung dazugegeben und bei mässiger Hitze verascht. Wenn keine braunen Dämpfe mehr entweichen, ist die Veraschung beendet. Sollte der Rückstand noch stark braun gefärbt sein, so ist nochmals 1 ccm Säuremischung zuzugeben und zu veraschen. Nach dem Abkühlen der Kolben gibt man vorsichtig 5 ccm aqua bidest. zu und kocht 3-5 min. auf. Anschliessend wird in einen 25-ccm-Messkolben überführt (quantitativ!: Mindestens 3mal mit kleinen aqua bidest.Portionen nachspülen). Es wird 1 Tropfen

p-Nitrophenollösung zugesetzt und aus einer Bürette langsam mit Ammoniak tropfenweise neutralisiert (Farbumschlag des Indikators nach Gelb). Zur Farbreaktion werden 5 ccm Ammoniummolybdatlösung zugegeben und 1 ccm Eikonogenlösung, bis zur Marke mit Wasser auffüllen und für 10 min. in ein Wasserbad von 37° C und ebenso lange in ein solches von Zimmertemperatur stellen. Zwei Kontrollwerte mit je 2,0 ccm Standardlösung werden mit einigen Tropfen konz. Schwefelsäure angesäuert, ebenfalls mit Ammoniaklösung gegen p-Nitrophenol neutralisiert und weiter wie die Messwerte behandelt. Gegen einen Reagenzienleerwert wird schliesslich im Stufo mit Filter S 72 oder im Spektralphotometer bei 700 mμ abgelesen. Sämtliche Bestimmungen werden als Doppelansatz ausgeführt. Standardlösungen müssen jedesmal mitlaufen.

Berechnung: Die Berechnungsgrundlage bildet eine einmal aufgenommene Eichkurve und die jeweiligen Phosphorstandardwerte. Die gefundene Standardextinktion wird auf 1 γ P in 25 ccm und 1 cm Schicht umgerechnet (entspricht 0,006) und durch diesen Wert die Messextinktion dividiert. Das Ergebnis wird mit der Serumverdünnung multipliziert und gibt mg% Lipoid-P an. Durch Multiplikation mit 25 kann man diesen Wert als Lezithin-Menge umrechnen.

$$\frac{\text{E Messwert} \times \text{Konz.Standard im } \gamma}{\text{E Standard}} = \text{P-Gehalt der Probe in } \gamma/25 \text{ ccm.}$$

Reagenzien:

1. 2,5 %iges Ammoniummolybdat in 3 n Schwefelsäure;
2. Eikonogenlösung (= reduzierende Lösung) : 0,5 g umkristallisiertes Eikonogen (1,2,4,-Aminoaphtholsulfonsäure) in 195 ccm 15 %iger wässr. $NaHSO_3$-Lösung und 5,0 ccm 20 %iger Natriumsulfitlösung lösen. (Die Lösung muß mindestens 2 Tage altern, bei Gelbfärbung verwerfen);

2a. Umkristallisieren des Eikonogens: 1 l Wasser wird auf 90° C erhitzt, darin werden 150 g Natriumhydrogensulfat und 10 g Natriumsulfit gelöst. In diese Mischung trägt man 15 g Eikonogen ein. Man filtriert heiss durch ein Faltenfilter und kühlt unter der Wasserleitung ab. Danach versetzt man das Filtrat mit 10 ccm konz. Salzsäure, die anfallenden Kristalle werden abgenutscht und mit 300 ccm kaltem Wasser und 50-100 ccm 96 %igem Alkohol nachgewaschen. Diese Prozedur muß evtl.

wiederholt werden. Trocknen im Exsikkator über Natriumhydroxyd-Plätzchen unter Lichtausschluss. In dunkler Flasche aufbewahren.

3. Phosphorsäurestandard. Kaliumphosphat- (primär)-Titrisol "Merck" 0,0667 mol wie üblich auf 1000 ccm auffüllen. Von dieser Lösung nimmt man 10,0 ccm und füllt sie erneut auf 1000 ccm mit bidest. Wasser auf. 1 ccm dieser Endverdünnung enthält 20,65 γP;
4. Veraschungsmischung: rauchende Salpetersäure und konz. Schwefelsäure werden im Verhältnis 1:1 gemischt.
5. 0,1 %ige wässr. p.-Nitrophenollösung in Wasser;
6. konz. Ammoniaklösung (25 %ig).

Bestimmung von freiem und verestertem Cholesterin (16).
In einem 25-ccm-Meßkolben gibt man zu 10 ccm Äthanol-Aceton-Gemisch 1 ccm Serum unter kräftigem Schütteln. Nach Aufkochen im Wasserbad und Abkühlenlassen wird mit Äthanol/Azeton bis zur Marke aufgefüllt und anschließend durch ein weiches Filter filtriert (Schleicher und Schüll Nr. 588 Faltenfilter).
Gesamtcholesterin (Doppelansatz):
Je 2,5 ccm Filtrat werden im Sandbad (Temperaturkontrolle!) zur Trockene eingedampft und mit 3 ccm Eisessig versetzt und kurz erwärmt, bis sich der Rückstand völlig gelöst hat. Auf Zimmertemperatur abkühlen lassen. Farbreaktion s. u.
Freies Cholesterin (Doppelansatz):
In einem spitzen Zentrifugenglas werden 2,5 ccm Filtrat bis auf etwa 1 ccm eingedampft (Wasserbad oder Sandbad) und 1 ccm Digitoninlösung dazugegeben, nach gründlichem Mischen 10 min. stehen lassen. Anschließend scharf zentrifugieren, die überstehende Flüssigkeit mit einem Saughaken abziehen und 4 ccm Aceton zugeben, aufschütteln und nach 10 min. Stehen nochmals abzentrifugieren. Das Lösungsmittel wird wieder abgesaugt und das Röhrchen im Vakuum getrocknet. Zum trockenen Niederschlag werden 3 ccm Eisessig gegeben und das Röhrchen kurz bis zur Lösung des Cholesterindigitonids im Sandbad erwärmt. Nach dem Abkühlen auf Zimmertemperatur wird die Farbreaktion angesetzt, indem man 2 ccm Farbreaktionsverdünnung zutropfen läßt. Sofort im Anschluß daran muß mit einem dicken Glasstab so lange gemischt werden, bis eine homogene Flüssigkeit vorliegt. Keinesfalls dürfen bei einer Reihenbestimmung erst alle Röhrchen mit

dem Farbreagenz versehen und danach gemischt werden. Dann bekommt man keine gleichmäßigen Ergebnisse. Aus demselben Grunde läßt man das Farbreagenz in die Röhrchen tropfen und nicht am Rand entlangrinnen, so daß der Eisessig unterschichtet wird. Nach dem Abkühlen wird mit Filter S 55 im Stufo oder bei 560 mμ im Spektralphotometer gegen den Leerwert kolorimetriert.

Berechnung: $\frac{\text{Ext.Mess. x 100}}{\text{Ext.Stand.}}$ = mg% Cholesterin.

Gesamtcholesterin minus freiem Cholesterin = Estercholesterin.

Reagenzien:

1. Äthanol/Azetonmischung;
2. Digitoninlösung: 1 g Digitonin in 50 ccm 96 %igen Alkohol unter Zugabe von 20 ccm Wasser durch leichtes Erwärmen lösen und schließlich auf 100 ccm mit dest. Wasser auffüllen;
3. Eisenchlorid-Stammlösung: 2,5 g $FeCl_3$ x 6 H_2O in 25 ccm Eisessig (mindestens 96 %ig) lösen. Aufbewahren in Säureflasche im Eisschrank, beim Auftreten von Trübungen verwerfen; Farbreagenz: 1,0 ccm Eisenstammlösung mit konz. Schwefelsäure auf 100 ccm auffüllen;
4. Cholesterinstandard: 100 mg reinen und trockenen Cholesterins in Eisessig (100 ccm) lösen. 10 ccm dieser Stammlösung werden auf 300 ccm mit Eisessig verdünnt und enthalten 0,1 mg in 3 ccm.

Die Farbreaktionsverdünnung wird ebenfalls in einer Säureflasche vor dem Eindringen von Luftfeuchtigkeit geschützt. Die Cholesterinstandardlösung und die Cholesterinverdünnung müssen in braunen Flaschen licht- und feuchtigkeitsgeschützt aufbewahrt werden.

Ges.-EW-Bestimmung nach der Biuret-Methode.

0,2 ccm Serum werden mit 4,8 ccm Kochsalzlösung verdünnt und mit 5,0 ccm Biuretreagenz im Reagenzglas gut vermischt. Nach 30 min. Stehen bei Zimmertemperatur kolorimetriert man gegen den Leerwert (5,0 ccm NaCl-Lösung und 5,0 ccm Biuretreagenz) im Stufo mit Filter S 53 in der 2-cm-Küvette: Spektralphotometer 555 mμ. Eine Eichkurve durch Vergleich der Ges.-N-Bestimmung mit der Biuretmethode einer Serumverdünnungsreihe ist unbedingt erforderlich. Dabei ist darauf zu achten, daß pathologische Seren eine Abweichung der Ges.-N-Werte von denen, die mit der Biuretmethode gewonnen wurden, zeigen können.

Man geht dabei so vor, daß man sich von mehreren Seren ein "Mischserum" herstellt und davon eine Verdünnung 1:1, 1:2 und 1:3 - außer dem unverdünnten Serum - sowohl durch Ges.-N-Bestimmung als auch durch die Biuretreaktion bestimmt. Die erhaltenen Werte trägt man gegeneinander auf Millimeterpapier auf.

Reagenzien: 0,9 %ige Kochsalzlösung.

Biuret-Reagenz nach Weichselbaum: 45 g Kaliumnatriumtartrat in etwas Wasser lösen, unter Umschütteln 5 g Kupfersulfat dazugeben. Nach dessen vollständiger Lösung gibt man den Inhalt zweier Fixanal-(Titrisol)-Ampullen 0,1 n NaOH dazu und bringt 5 g Kaliumjodid in den Meßkolben ein. Es wird mit Wasser auf 1000 ccm aufgefüllt und die fertige Lösung in einer Polyäthylenflasche im Eisschrank aufbewahrt. Die Lösung muß etwas altern, sie ist 24 Std. nach dem Ansetzen gebrauchsfertig.

Rest-N-Bestimmung.

2 ccm Serum werden mit 2 ccm Wasser versetzt und mit 2 ccm Trichloressigsäure enteiweißt. 3 ccm Filtrat (entsprechend 1 ccm Serum) werden in einen Veraschungskolben nach Kjeldahl gegeben. Nach Zufügen von 1 ccm konz. Schwefelsäure und einiger Körnchen Kupfersulfat und Kaliumsulfat wird bis zum schwachen Sieden der Schwefelsäure etwa 15 min. lang erhitzt. Die Veraschungslösung soll schließlich klar hellblau (Kupfersulfat!) sein. Nach Abkühlen des Veraschungskolbens wird der Inhalt mit etwas aqua dest. verdünnt und durch den Trichter quantitativ in die Destillierapparatur überführt. In die Vorlage gibt man 5,0 ccm 2 %ige Borsäure und 2-3 Tropfen Indikator. Das Ausflußrohr des Kühlers muß in die Borsäurelösung eintauchen. Nachdem man in den Verdampfungskolben noch 1-5 ccm Natronlauge gegeben hat, wird für 10 min. Dampf durch die Apparatur geleitet. Danach setzt man die Vorlage etwas niedriger, so daß das Kühlerrohr nicht mehr in die Vorlage eintaucht und läßt noch etwa 5 min. zur Spülung des Kühlers destillieren. Danach spült man das Kühlerohr von außen mit einer Spritzflasche ab und titriert die Borsäurelösung mit Schwefelsäure auf farblos zurück. Der Umschlag des Indikators erfolgt von Grün (über p_H 5,6) nach Rot (unterhalb 5,3) (s.a. Gesamteiweißbestimmung). Statt der Borsäure kann man 10 ccm 0,01 n H_2SO_4 vorlegen und mit

NaOH (0,01 n) zurücktitrieren.
Berechnung: Bei der Borsäuremethode ist eine vorherige Titerstellung unnötig. Die verbrauchten ccm 0,01 n H_2SO_4 sind der überdestillierten Ammoniakmenge äquivalent (1 ccm 0,01 n H_2SO_4 = 0,14 mg N). Bei Verwendung von 1 ccm Serum : verbrauchte ccm Säure x 14 = mg% Rest-N.
Reagenzien:
Trichloressigsäure p.a. 10 %ige wässrige Lösung,
konz. Schwefelsäure,
Kupfersulfat, Kaliumsulfat, 0,01 n Schwefelsäure (oder 2 %ige Borsäurelösung),
0,01 n NaOH,
33 %ige NaOH.

Orientierende Takatareaktion.
0,25 ccm Serum werden in ein Reagenzglas gegeben, das 5 ccm Takatareagenz und 1 ccm Sublimatlösung enthält, und die Pipette wird sorgfältig ausgeblasen. Durch vorsichtiges Umschwenken wird sorgfältig gemischt. Nach 30 min. Stehen bei Zimmertemperatur wird abgelesen. Wegen der Temperaturempfindlichkeit der Reaktion soll nur bei konstanter Zimmertemperatur (20 - 22° C) oder im Wasserbad gearbeitet werden. Das Ergebnis der orientierenden Prüfung wird beim Ausbleiben einer Trübung als negativ bezeichnet.
Takatareagenz: 20,0 g Na_2CO_3 sicc. + 7,0 g NaCl ad 1000 ccm aq.dest.
Die Sublimatlösung ist 0,3 %ig.

Thymoltrübungstest (Mac Lagan).
0,05 ccm Serum und 3,0 ccm Thymolpufferlösung werden gemischt, nach 30 min. nochmals durchmischt, und anschließend wird die Trübung durch Vergleich mit der Standardtrübung im Stufenphotometer gemessen. Auf eine eventuelle Flockung kann man die Röhrchen nach 24 Std. noch einmal prüfen.
Trübungen bis 4 Mac Lagan-Einheiten werden als normal angesehen. Erfahrungsgemäß liegt jedoch der Grenzwert bei 10 Einheiten. Erst von undurchsichtiger Trübung bzw. deutlichem Bodensatz ab gelten Trübung oder Flockungswerte als pathologisch.
Reagenzien: Veronal, Veronalnatrium, Thymol, Sulfosalizylsäure 3 %ig.

1. Herstellung der Stammlösung. 1,38 g Veronal, 1,03 g Veronalnatrium und 3 g Thymol werden mit 500 ccm aqua bidest. bis zum Aufkochen erwärmt, gut geschüttelt und gründlich abgekühlt. Nach Abkühlen auf 25° C wird mit 2-3 kleinen Thymolkristallen geimpft, 2-3 min. kräftig geschüttelt und die Lösung über Nacht stehen gelassen. Nach Filtration der abgeschiedenen Kristalle ist die Lösung gebrauchsfertig. Ihr p_H liegt bei 7,8. Nach neueren Ergebnissen ist die Probe bei p_H 7,55 empfindlicher (Heepel). Hierzu wird die Thymolpufferlösung nach Mac Lagan (Stammlösung Merck) empfohlen. Die Lösung ist 8-14 Tage haltbar. Sie wird bei 20-25° C aufbewahrt. Für die Thymolprobe darf nur eine klare Lösung verwendet werden.
2. Trübungsstandard nach Kingsbury. Aus normalem Blutserum stellt man sich mit physiol. Kochsalzlösung 10 Verdünnungen her, deren Eiweißgehalt zwischen 10 und 100 mg% liegt, mit Abständen von je 10 mg%. In 10 Reaktionsröhrchen versetzt man immer 1 ccm einer Verdünnung mit 3 ccm 3 %iger Sulfosalizylsäurelösung. Die verschieden starken Trübungen unterscheiden sich bei benachbarten Röhrchen jeweils um eine sog. Mac Lagan-Einheit, entsprechend der Differenz von 10 mg% Eiweiß. Der Trübungsstandard ist nur begrenzt haltbar.

Die elektrophoretische Analyse der Serumproteine, Lipo- und Glykoproteide wurde papierelektrophoretisch nach der Methode Grassmann und Hannig vorgenommen.

Papier: Für Elektrophoresezwecke werden Papiersorten benötigt, die eine geringe Adsorptionsfähigkeit, hohe Naßfestigkeit sowie eine mittlere Wanderungsgeschwindigkeit gewährleisten und sich durch gute Lichtdurchlässigkeit und Homogenität auszeichnen. Diese Anforderungen werden durch die Sorten Whatman Nr. 1 sowie Schleicher und Schüll Nr. 2043 a erfüllt. Die Abmessungen der Streifen betragen 40 x 300 mm. Sie können auf dieses Format zugeschnitten werden oder auch fertig durch den einschlägigen Handel bezogen werden.

Auftragepipette: Zum Auftragen des Serums auf den Papierstreifen wird eine 0,01-ccm-Pipette mit Hundertstelteilung benötigt, die an der Spitze plan geschliffen ist, um ein Aufrauhen des Papiers zu vermeiden.

Puffer: Veronal-Azetat-Puffer, der ein p_H von 8,6 und eine Ionenstärke U = 0,1 aufweist.

Medinal	29,428 g
Na-Azetat	19,428 g
n/10 HCL	180 ccm
aqua dest. ad . . .	3000 ccm

Proteinfärbung: Verwendet wird eine gesättigte Lösung von Amidoschwarz 10 B (Bayer) in Methanol/Eisessig im Verhältnis 9:1.

Entfärbelösung: Methanol/Eisessig im Verhältnis 9:1.

Glasschalen 10 x 20 cm, die gut verschließbar sind, zum Färben und Entfärben.

Transparenzflüssigkeit: Zum Transparentmachen der gefärbten Streifen wird ein Gemisch von Paraffinöl und alpha-Bromnaphthalin verwendet, das den Brechungsindex n_D = 1,51 aufweist.

Glasplatten: Die transparenten Streifen müssen zum Auswerten zwischen plane Glasplatten von etwa 1 mm Stärke gelegt werden, die die Abmessungen der Papierstreifen besitzen.

Die Elektrophoresekammer ist im Prinzip eine feuchte Kammer mit Pufferbehältern an beiden Enden. In diese tauchen Labyrinthelektroden, die ebenso wie die unterteilten Pufferbehälter zur Vermeidung von Elektrolytverschiebungen dienen. Auf dem flachen mittleren Teil der Kammer liegen herausnehmbare Brücken, auf die jeweils zwei Papierstreifen aufgespannt werden. Die Kammer ist durch eine Glasplatte verschließbar.

Stromquelle: stabilisierte Gleichspannung, die entsprechenden an das Netz anschließbaren Geräten entnommen werden kann. Es handelt sich hierbei im Prinzip um einen Gleichrichter mit Spannungsteiler, so daß verschiedene, jeweils benötigte Spannungen abgegriffen werden können. Für gewöhnlich werden 110 V verwendet.

Die photoelektrische Auswertung erfolgt am besten mit dem Elphor-Integraphen der Fa. Bender und Hobein, welcher neben einer direkten selbsttätigen Schreibung der Extinktionskurve gleichzeitig auch durch automatische Integration der von der Extinktionskurve umschriebenen Fläche und Errechnung der relativen Prozente eine vollautomatische Auswertung der Elektrophoresestreifen durchführt.

Ansetzen der Serumanalyse.
Auf dem Papierstreifen wird in etwa 8,5 cm Abstand vom rechten Rand die Auftragstelle durch einen dünnen senkrechten Bleistiftstrich markiert und gleichzeitig der Streifen gekennzeichnet. Darauf wird 0,01 ccm Serum mit einer Spezialpipette unter Zuhilfenahme eines Lineals zügig und gleichmäßig auf die markierte Stelle aufgetragen. Der Serumstrich soll eine Länge von etwa 3 cm haben und 0,5 cm vom Längsrand entfernt sein, damit störende Effekte bei der Auftrennung vermieden werden.
Darauf werden die Streifen durch mehrmaliges Abrollen auf einer Walze, die in eine mit Pufferlösung gefüllte Wanne taucht, gleichmäßig und ausreichend befeuchtet. Sie werden anschließend auf die Brücke der Elektrophoresekammer gespannt, so daß die beiden Enden auf dem Querbalken der Brücke ruhen und in die Pufferbehälter der Kammer eintauchen. Die Auflagestellen der Brücke werden zum Zwecke des besseren Haftens zuvor mit Puffer befeuchtet. Nachdem die Brücke mit zwei Streifen beschickt worden ist - hierbei ist zu beachten, daß die Auftragestellen beider Streifen auf der gleichen Seite der Brücke liegen -, wird sie in die Elektrophoresekammer eingesetzt.
Die beiden seitlichen Pufferbehälter der Elektrophoresekammer sind mit etwa 250 ccm Puffer gefüllt, so daß die Labyrinthelektroden und die mit Glaswolle abgedichtete Verbindung beider Abteilungen bedeckt sind. Der Pufferspiegel soll in beiden Pufferbehältern zur Vermeidung von Heberwirkungen gleich hoch sein. Nach Einsetzen der Brücke wird die Kammer mit dem dazugehörigen Glasdeckel verschlossen. Jetzt werden die Elektroden an die Stromquelle angeschlossen, und zwar der Minuspol an der Seite der Kammer, an welcher sich das mit Serum beschickte Ende des Streifens befindet. Die Spannung wird auf 110 V eingestellt. Da die Laufzeit 10-15 Std. beträgt, empfiehlt sich ein Ansetzen am Abend. Die elektrophoretische Auftrennung vollzieht sich über Nacht und macht keine besondere Aufsicht notwendig. Sie erfolgt am zweckmäßigsten bei + 10° im Kühlschrank.

Entwickeln der Elektropherogramme.
Nach Beendigung des Elektrophoreseversuches wird der Stromfluß unterbrochen und die Kammer geöffnet. Dabei muß man darauf achten, daß kein Kondenswasser, das in Tropfen am Glasdeckel

hängt, auf die Papierstreifen tropft. Beim Abnehmen von der Brücke dürfen die Streifen nur an den Enden berührt werden. Die in die Pufferlösung tauchenden Anteile werden abgeschnitten. Der Papierstreifen wird dann zum Trocknen auf einen Glasstab oder mittels Filmklammern auf einen Draht gereiht.
Die Streifen werden nun für mindestens 10 min. in das Färbebad gegeben und danach in mehreren Entfärbebädern entfärbt. Im allgemeinen genügt es, 5 Bäder mit 10, 30, 30,60 und 60 min. Entfärbezeit zu verwenden.
Die entfärbten Streifen werden luftgetrocknet und darauf transparent gemacht, indem sie für einige Stunden in die Transparenzflüssigkeit gelegt werden.

Auswertung:
Zur Auswertung werden die transparenten Streifen zwischen zwei plane Glasplatten eingebettet und dann mit Filterpapier abgewischt. Hierbei dürfen keine Luftbläschen mit eingeschlossen sein.
Bei Verwendung des Extinktionsschreibers der Fa. Zeiss werden die Elektrophoresekurven automatisch aufgezeichnet. Für jede Fraktion wird die entsprechende Gaussche Kurve eingezeichnet. Die Überschneidungen der Gausschen Kurven im Minimum der Gradientenkurven sollen kongruente Flächen ergeben, wobei ferner darauf zu achten ist, daß die eingezeichneten Kurven symmetrisch sind. Da bei der Wanderung der Proteine auf dem Papier immer kleine Eiweißmengen auf dem zurückgelegten Weg haften bleiben, werden ohne Berücksichtigung dieser Tatsache die einzelnen Globulinfraktionen, am meisten die gamma-Glob.-Fraktion, um diesen Betrag größer gemessen. Dies kommt bei der Auswertung auch dadurch zum Ausdruck, daß auf der Strecke zwischen der gamma-Glob.-Fraktion und dem Startpunkt noch Extinktionen über dem Nullpunkt gemessen werden, die diesen haften gebliebenen Proteinen entsprechen. Die Nullinie stellt somit nicht die eigentliche Basis der Gausschen Kurven dar. Der Fehler wird dadurch berichtigt, daß man eine Linie vom Beginn der Albuminfraktion bis zum Ende der gamma-Glob.-Fraktion zieht, die als Basislinie bezeichnet wird und die annähernd die Basis der Gausschen Kurven darstellt. Die Gausschen Kurven werden nun planimetriert. Der Pol des Planimeters wird mit der Nadelspitze auf das Papier gestellt und

die Verbindung mit dem Fahrarm hergestellt. Polarm und Fahrgestell bilden einen rechten Winkel, die Fahrspitze befindet sich etwa im Schwerpunkt der Kurve. Von einem markierten Punkt der Kurve wird diese im Uhrzeigersinn umfahren, nachdem die Meßrolle auf Null eingestellt worden ist. Die Ablesung ergibt eine dreistellige Zahl: am Nonius werden die Einer, auf der Meßrolle die Zehner und Hunderter abgelesen. Eine Noniuseinheit = 4 mm^2. Die Flächenwerte aller Fraktionen werden = 100 % gesetzt, so daß man den prozentualen Anteil jeder Fraktion errechnen kann und die relativen Werte (rel%) erhält. Zur Ermittlung der Werte in g% Eiweiß ist die Bestimmung des Gesamteiweißes notwendig. Die Summe aller Fraktionen = 100 % entspricht dann dem Gesamteiweißgehalt, der Anteil der einzelnen Fraktionen läßt sich daraus ohne Schwierigkeiten berechnen.

Lipidelektrophorese.
Die Darstellung der Serumlipide ist dadurch möglich, daß sie selektiv, ohne Mitbeteiligung des Proteinanteils, anfärbbar sind. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgt wie oben. Hierzu werden 0,03 ccm Serum benötigt. Färbung in Anlehnung an Swahn.:
Färbelösung: 0,1 g Sudanschwarz B in 100 ccm 60 %igem Äthanol lösen, bis zum Sieden erhitzen, heiß filtrieren und sofort zum Färben verwenden.
Die Papierstreifen werden etwa 30-45 min. gefärbt, dann mit 60 %igem Alkohol über 10 min. bei dreimaligem Wechsel entfärbt. Die noch feuchten Streifen werden in Glycerin transparent gemacht und, wie oben, photometrisch ausgewertet.

Glykoproteidelektrophorese.
Die Anfärbung der Kohlehydrate beruht auf dem Verfahren von Hotchkiss, das für die Anfärbung der proteingebundenen KH von Köiv und Grönwall modifiziert wurde. Die Färbung beruht im Prinzip auf der Oxydation der in Glykolbindung befindlichen Oxygruppen durch Perjodsäure und einer Anfärbung der Aldehydgruppen mit Schiffschem Reagenz (Fuchsin-Schwefelsäure).
Für die Oxydation werden 1,2 g Perjodsäure in 30 ccm dest. Wasser gelöst und 15 ccm einer 5-mol-Na-Azetat-Lösung sowie 100 ccm Äthanol hinzugefügt. Die Papierstreifen werden für

5 min. in die frisch angesetzte Perjodsäurelösung gelegt, darauf in 70 %igem Äthanol gebadet; sie verweilen für 8 min. in einer Reduktionslösung (5 g KJ, 5 g Na-Thiosulfat in 100 ccm dest. Wasser und 150 ccm Äthanol, ferner werden 2,5 ccm 2-n-HCl allmählich hinzugefügt) und werden wieder in 70 %igem Äthanol gebadet. Erst nach dieser Vorbereitung wird mit Fuchsin gefärbt. Herstellung des Farbbades: Man löst 1 g basisches Fuchsin in 200 ccm siedendem destillierten Wasser, kühlt auf 50° C ab und versetzt mit 1 ccm konzentrierter Salzsäure (36-39 %) + 2 g $NaHSO_3$ oder $K_2S_2O_5$. Die verschlossene Flasche wird öfters geschüttelt und für 24 Std. bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Danach schütteln mit 0,5 g Knochenkohle und Giessen durch ein hartes Filter; das Filtrat soll klar und farblos sein, eine rosa Schimmer kann durch Zutröpfeln von HCl rückgängig gemacht werden. Diese Stammlösung ist im Eisschrank bei Dunkelheit 2-3 Tage haltbar. Zur Färbung werden die Streifen für 40 min. in ihr gebadet; dabei färbt sich auch die Zellulose, entsprechend ihrer Kohlehydratnatur, irreversible rosa. Die karminroten Streifen der kohlehydratreichen Stellen können durch Direktkolorimetrierung bestimmt werden.
Die Zählung der roten und weißen Blutkörperchen erfolgte nach dem Zählkammerprinzip.
Die Färbung der Blutausstriche erfolgte nach Pappenheim. Sie ist eine kombinierte May-Grünwald-Giemsa-Färbung.
Reagenzien:

May-Grünwald-Lösung

Eosinsaures Methylenblau	1,0
Methylalkohol	100,0
Glycerin	50,0

Giemsa-Lösung

Azur II-Eosin	3,0
Azur II	0,8
Glycerin	ad 250,0

Reagenz bei 60° C lösen
Methylalkohol . . . . . 250,0 dazugeben,
24 Std. stehen lassen und filtrieren.

Die Fixierung des luftgetrockneten Blutausstriches erfolgt mit May-Grünwald-Lösung. Man legt den Blutausstrich mit der Schichtseite nach oben auf eine Färbebank, bedeckt ihn mit

Farblösung und läßt die konzentrierte May-Grünwald-Lösung für 3 min. einwirken. Anschließend gibt man auf den Objektträger die gleiche Menge aqua dest. und färbt weitere 5 min., spült dann mit aqua dest. ab und läßt das Präparat kurz trocknen. Es folgt nun die Färbung mit Giemsa-Lösung. Vor Gebrauch wird die Stammlösung im Verhältnis von 1 Tropfen Farblösung auf 1 ccm aqua dest. neutr. verdünnt. Man bedeckt die Schichtseite des Ausstriches mit der verdünnten Giemsa-Lösung und läßt sie für 20-25 min. einwirken, spült die Farblösung mit aqua dest., dann unter Leitungswasser ab. Um eine möglichst gute Färbung zu erhalten, kann man das Wasser 1 min. auf dem Präparat stehen lassen und erst dann abkippen. Zum Schluß reinigt man die Objektträgerunterseite von Farbresten und läßt die Präparate schräg aufgestellt an der Luft trocknen.

Die Darstellung der Organschnitte erfolgte mittels der Hämatoxylin-Eosin-Färbung von Heidenhain und der Sudan-Fettfärbemethode.

Ergebnisse.

Die Ergebnisse vorliegender Untersuchungen sind in den Tabellen 1, 2, 3, 4 und 5 sowie in den Abbildungen 2, 3, 4 und 5 zusammenfassend wiedergegeben.

1. Verhalten der Serumlipide (s. Tab. 1).

Die bei unbehandelten Kaninchen gefundenen Lipidwerte bewegen sich in folgenden Grenzen (ohne Berücksichtigung strenger statistischer Maßstäbe): für Ges.-Fett zwischen 394,0 mg% und 799,0 mg% (M = 586 mg%); für freies Cholesterin zwischen 22,0 mg% und 51,0 mg% (M = 37 mg%); für Cholesterinester zwischen 62,0 mg% und 91,0 mg% (M = 67 mg%); für Ges.-Cholesterin zwischen 86,0 mg% und 142,0 mg% (M = 115,0 mg%); für % Cholesterinester zwischen 63 % und 74 % (M = 68 %); für Phosphatide zwischen 113,0 und 170,0 mg% (M = 145,0 mg%).

Bereits bei erster Kontrolle ließ sich bei allen Tieren ein deutlicher Anstieg aller Serumlipide mit Ausnahme der Cholesterinester aufzeigen. Der Cholesterinestergehalt, ausgedrückt in %,

	Ges.-Fett	Cholesterin			Chol. Ester	Phosphatide
		Freies	Ester	Ges.		
	mg%	mg%	mg%	mg%	%	mg%
Tier A.	708,0	27,0	71,0	98,0	74	138,0
Nr.1 4Wochen	1230,0	84,0	74,0	158,0	47	260,0
8Wochen	4100,0	114,0	98,0	212,0	46	395,0
12Wochen	6208,0	270,0	166,0	436,0	38	480,0
16Wochen	7650,0	385,0	217,0	602,0	36	648,0
20Wochen	8910,0	407,0	398,0	805,0	49	885,0
24Wochen	10660,0	489,0	403,0	892,0	45	992,0
Tier A.	539,0	34,0	78,0	112,0	65	151,0
Nr.2 4Wochen	665,0	66,0	79,0	145,0	54	187,0
8Wochen	768,0	88,0	86,0	174,0	49	218,0
12Wochen	2870,0	230,0	148,0	378,0	39	440,0
16Wochen	7560,0	351,0	196,0	547,0	36	596,0
20Wochen	9244,0	317,0	275,0	592,0	47	638,0
24Wochen	14190,0	408,0	312,0	720,0	43	727,0
Tier A.	799,0	51,0	86,0	137,0	63	170,0
Nr.3 4Wochen	1442,0	87,0	89,0	176,0	50	260,0
8Wochen	2950,0	257,0	146,0	403,0	36	544,0
12Wochen	3412,0	359,0	238,0	597,0	40	688,0
16Wochen	4518,0	366,0	346,0	712,0	49	814,0
20Wochen	5636,0	421,0	388,0	809,0	48	926,0
24Wochen	6862,0	682,0	416,0	1098,0	38	1112,0
Tier A.	394,0	22,0	62,0	86,0	72	113,0
Nr.4 4Wochen	748,0	35,0	63,0	98,0	64	147,0
8Wochen	1250,0	102,0	86,0	188,0	46	240,0
12Wochen	2786,0	265,0	147,0	412,0	36	455,0
16Wochen	2915,0	264,0	212,0	476,0	44	488,0
20Wochen	3020,0	271,0	246,0	517,0	48	636,0
24Wochen	3620,0	778,0	306,0	784,0	39	795,0
Tier A.	490,0	51,0	91,0	142,0	64	165,0
Nr.5 4Wochen	730,0	103,0	95,0	198,0	48	287,0
8Wochen	1212,0	177,0	109,0	286,0	38	292,0
12Wochen	2358,0	174,0	134,0	308,0	44	310,0
16Wochen	4386,0	247,0	213,0	460,0	46	468,0
20Wochen	5006,0	286,0	256,0	542,0	47	698,0
24Wochen	5800,0	394,0	302,0	696,0	43	814,0

Tab.1 . Serumlipide.

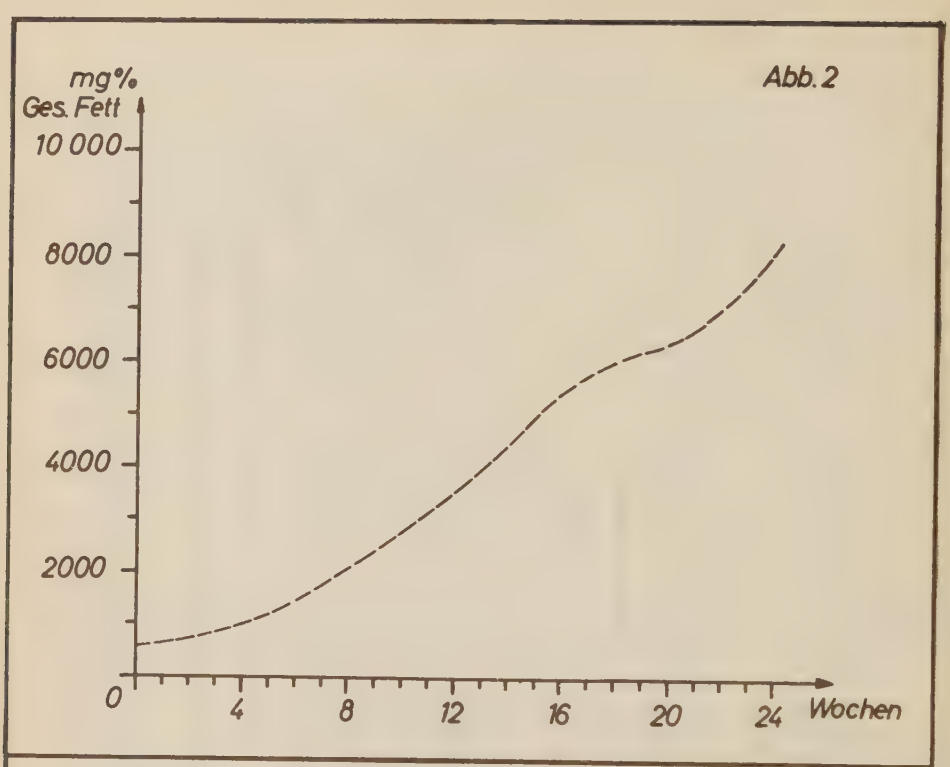
mg%
Ges. Fett
10 000
8000
6000
4000
2000
0
4
8
12
16
20
24
Wochen

Abb. 2

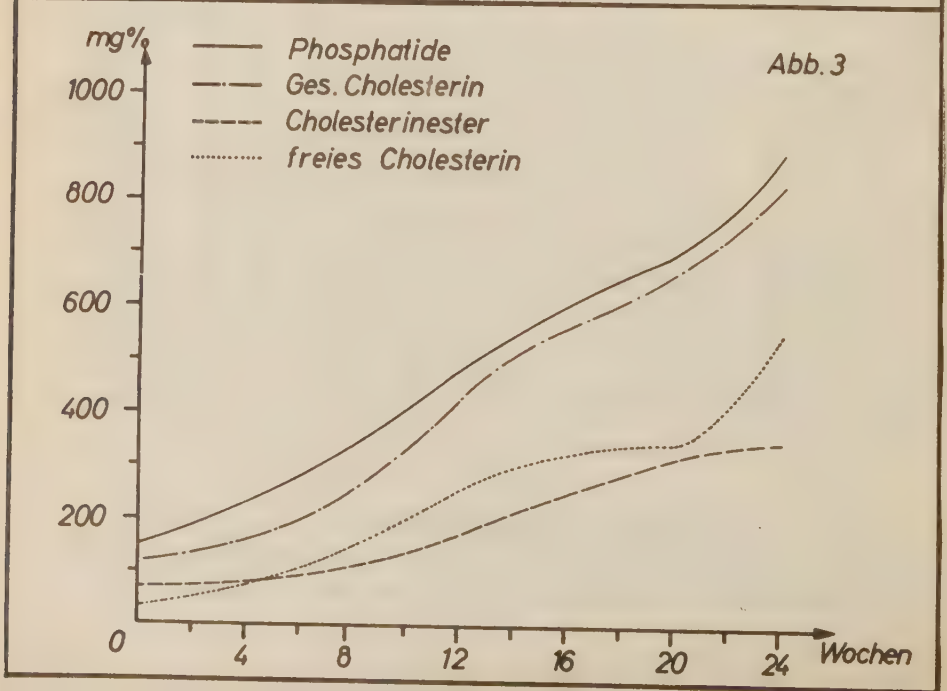
mg%
Phosphatide
Ges. Cholesterin
Cholesterinester
freies Cholesterin
1000
800
600
400
200
0
4
8
12
16
20
24
Wochen

Abb. 3

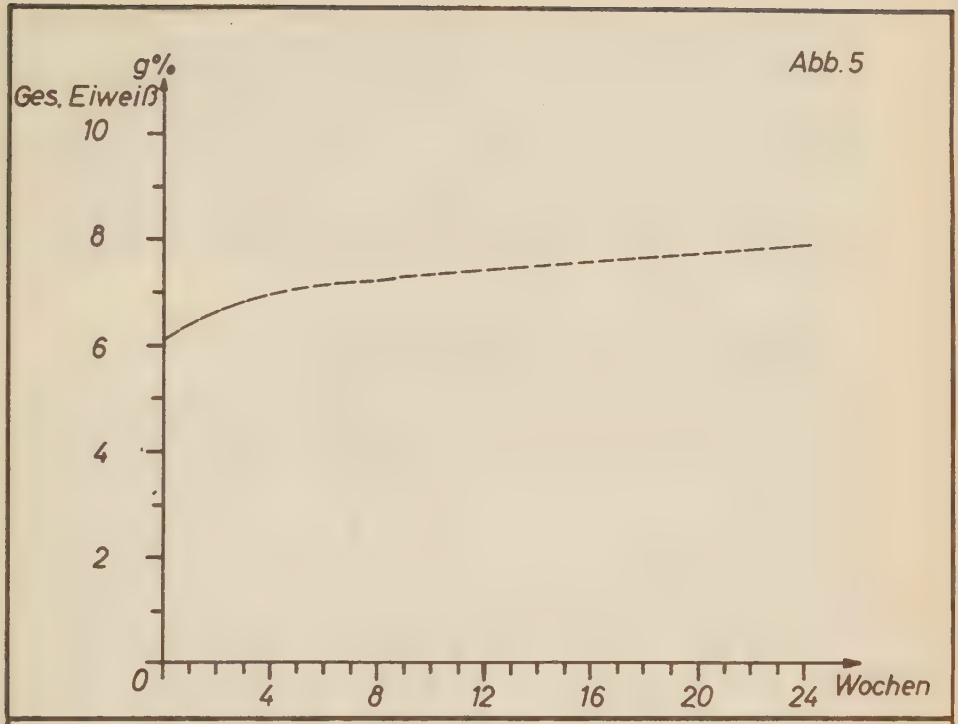
g%
Ges. Eiweiß
10
8
6
4
2
0
4
8
12
16
20
24
Wochen

Abb. 5

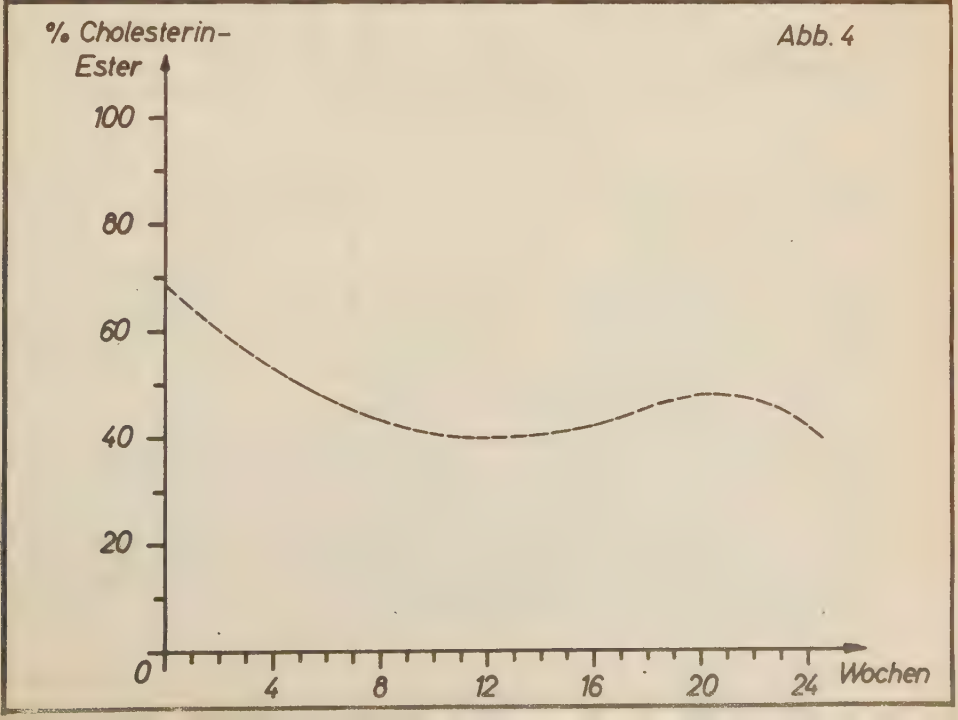
% Cholesterin-
Ester
100
80
60
40
20
0
4
8
12
16
20
24
Wochen

Abb. 4

nahm bei den in Versuch gestandenen Tieren ab (s. Abb. 4). In weiteren Kontrollen bis zum Abschluß der Versuchsserie konnte dieses Verhalten der Lipide gleichsinnig festgestellt werden, d. h. es kam bei allen Tieren zu einem kontinuierlichen Anstieg des Ges.-Fettes, des freien und Ges.-Cholesterins sowie der Phosphatide (s. Abb. 2 u. 3). Die Cholesterinester zeigten zwar ebenfalls eine Zunahme, bezogen auf das Gesamtcholesterin, jedoch konnte ein kontinuierlicher prozentualer Abfall festgestellt werden (vgl. Abb. 4).

2. Verhalten des Ges.-EW. und der Serumproteine sowie der Serumlabilitätsteste und des Rest-N.

Das Ges.-EW., das bei den in Versuch genommenen unbehandelten Kaninchen zwischen 5,0 g% und 7,2 g% (M = 6,1 g%) lag, ist während des Versuches gering angestiegen (vgl. Tab. 2 und Abb. 5).

Tier Nr.	A	4 Wochen	8 Wochen	12 Wochen	16 Wochen	20 Wochen	24 Wochen
1	5,9	6,9	7,2	7,4	7,8	7,8	8,0
2	5,5	6,8	7,2	7,5	7,5	7,9	8,0
3	7,0	7,3	7,3	7,4	7,6	7,7	7,8
4	7,2	7,3	7,4	7,6	7,8	7,9	7,9
5	5,0	6,6	7,0	7,3	7,5	7,8	7,8

Tab. 2 Gesamteiweiß in g%.

Vergleicht man Ausgangs- und Endwert, so ist der Unterschied für die Mittelwerte nicht significant.

Bei Proteinfärbung der elektrophoretisch getrennten Serumproteine kann beobachtet werden, daß es zu einem, wenn auch geringen, so doch kontinuierlichen Anstieg der beta-Glob. kommt. Bei Lipoidfärbung erkennt man ebenfalls eine Zunahme der im beta-Glob.-Bereich faßbaren Lipoproteide.
Bei KH-Färbung fällt eine enorme Anreicherung von Glykoproteiden ebenfalls im beta-Glob.-Bereich auf, dies insbesondere bei letzter Kontrolle. Im Vergleich hierzu zeigen die Ausgangswerte sowie die Befunde bei erster und auch zweiter Kontrolle Glykoproteide praktisch in allen Fraktionen mit deutlicher Anrei-

Tier Nr.	A	4 Wochen	8 Wochen	12 Wochen	16 Wochen	20 Wochen	24 Wochen
1	26,3	28,5	30,0	29,6	28,4	30,6	30,4
2	35,0	39,5	42,3	42,5	42,2	40,0	39,6
3	10,5	15,0	22,5	21,0	19,3	22,4	24,8
4	24,5	30,0	33,4	31,6	32,4	31,5	30,6
5	17,5	26,5	27,5	28,0	26,6	27,3	25,7

Tab. 3 Rest-N in mg%.

cherung allerdings im Albumin-, alpha- und beta-Glob.-Bereich, wobei hier jedoch keine der Fraktionen durch besondere Konzentration hervortritt.

Abb. 6 a zeigt die Pherogramme zu Beginn, Abb. 6 b am Ende der Versuchsserie.

Die Serumlabilitätsteste (s.o.) zeigten während und auch am Ende der Beobachtungszeit bei keinem der Versuchstiere nennenswerte Abweichungen vom Normalen. Dsgl. hielt sich der Rest-N bei allen Kontrollen in physiologischen Grenzen (vgl. Tab. 3).

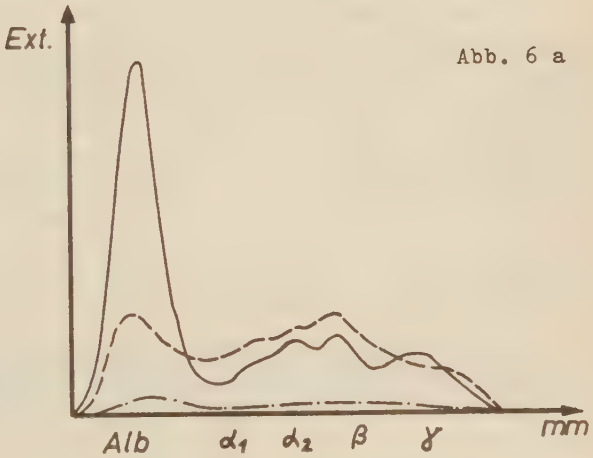

Abb. 6 a

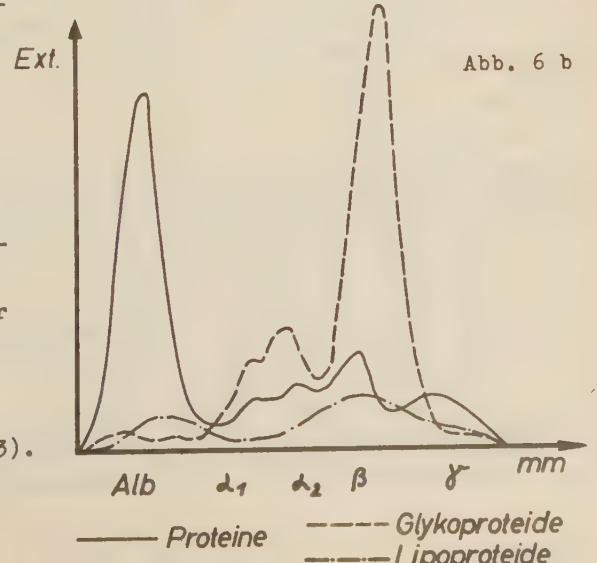

Abb. 6 b

Das Verhalten des peripheren Blutbildes.

Die Komposition der Blutelemente bei noch nicht mit Triton behandelten Kaninchen (Tab. 4) entsprach der für diese Tierspezies bekannten Verteilung, d. h. es ergab sich eine Erythrozytenzahl zwischen 4,2 und 5,8 Mill. (M = 4,9 Mill.) und eine Leukosytenzahl zwischen 4600 und 8500 (M = 6300).

Tab. 4 Peripheres Blutbild

		1. Kaninchen					
1	Erythr.	4,82	5,40	5,54	5,08	4,90	4,6
2	Leuko.	8550	14300	14550	16100	17900	1635C
3	Stabk.	1%	-	-	-	2%	-
4	Neutroph.	12%	14%	16%	18%	16%	12%
5	Eosinoph.	-	1%	-	4%	3%	2%
6	Basoph.	-	-	-	-	-	-
7	Lymphoc.	86%	84%	82%	76%	76%	86%
8	Monozyt.	1%	-	1%	1%	1%	-
9	Plasmaz.	-	1%	1%	1%	-	-
10	Erythrobl.	-	-	-	-	-	-
11	Proerythrobl.	-	-	-	-	2%	-

	2. Kaninchen						3. Kaninchen					
1	5,28	5,60	5,42	4,50	4,02	4,00	4,36	5,50	5,07	5,02	4,92	5,02
2	7200	12000	11800	18200	19150	18750	4800	9200	15350	18000	16900	17100
3	-	-	1%	-	2%	3%	1%	2%	1%	-	-	1%
4	9%	9%	7%	8%	6%	10%	20%	16%	14%	6%	12%	14%
5	-	-	2%	-	1%	2%	1%	2%	-	-	1%	-
6	-	1%	2%	1%	-	1%	1%	2%	1%	2%	1%	1%
7	91%	89%	87%	90%	90%	83%	76%	76%	81%	86%	85%	80%
8	-	-	1%	1%	-	1%	1%	2%	1%	2%	1%	2%
9	-	1%	-	-	-	-	-	-	1%	2%	-	1%
10	-	-	-	-	1%	-	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-	-	-	-	1%	2%	-	1%

	4. Kaninchen						5. Kaninchen					
1	5,80	5,15	5,40	5,02	4,12	4,00	4,22	5,00	5,15	4,88	4,16	4,20
2	4600	8400	8500	13000	19100	18200	6350	8800	11900	16900	19250	19300
3	-	-	2%	-	-	-	-	-	-	2%	1%	2%
4	21%	16%	12%	10%	12%	12%	34%	18%	20%	12%	14%	16%
5	-	1%	-	4%	1%	1%	1%	-	1%	2%	2%	2%
6	-	3%	2%	-	1%	1%	-	-	1%	2%	-	3%
7	79%	79%	80%	82%	81%	84%	64%	81%	78%	78%	83%	76%
8	-	-	1%	2%	2%	1%	1%	1%	-	2%	-	1%
9	-	1%	1%	-	1%	-	-	-	-	2%	-	-
10	-	-	-	-	1%	-	-	-	-	-	-	-
11	-	-	2%	2%	1%	1%	-	-	-	-	-	-
	A	4 Wo	8 Wo	12Wo	20Wo	24Wo	A	4 Wo	8 Wo	12Wo	20Wo	24Wo

Im Differentialausstrich fällt bei normalen Tieren die Relation zwischen Neutrophilen und Lymphozyten von 1:4 auf. Im Verlaufe des Versuches konnte bei allen Tieren eine deutliche Leukozytose mit Werten zwischen 13000 und 19300 (M = 15120) am Ende des Versuches beobachtet werden. Dabei konnte im Differentialblutbild keine Besonderheit festgestellt werden, ebenso wie die Erythrozyten keine nennenswerten Abweichungen gegenüber den Ausgangswerten erkennen ließen. Auffällig war lediglich, daß in den letzten beiden Kontrollen des Versuches die Erythrozyten eine besondere Neigung zur Konglomerat- bzw. Geldrollenbildung zeigten.
Schließlich sei noch folgende Beobachtungstatsache erwähnt: Blutentnahmen, die unmittelbar nach Tritoninjektion vorgenommen wurden, zeigten eine deutliche Hämolyse. Es wurde infolgedessen darauf geachtet, daß die Blutentnahmen frühestens 24 Std. nach einer vorangegangenen Tritoninjektion erfolgt sind. Das Serum der Versuchstiere war bereits bei erster Kontrolle und seitdem bis zum Abschluß der Versuchsreihe deutlich lipämisch.

Der Kräftezustand der Tiere war über die gesamte Beobachtungszeit als durchaus gut zu bezeichnen, was im übrigen auch der Gewichtstabelle (Tab. 5) zu entnehmen ist. Erst in der 2. Hälfte des Versuches wurden relativ geringe Allgemeinerscheinungen beobachtet, so Ödembildungen im Bereich des Kopfes und Juckreiz mit Kratzeffekten.

Tier Nr.	A	4 Wochen	8 Wochen	12 Wochen	16 Wochen	20 Wochen	24 Wochen
1	3400	3480	3550	3630	3670	3710	3750
2	4150	4230	4310	4380	4400	4480	4500
3	3700	3720	3790	3810	3850	3890	3950
4	3250	3310	3340	3400	3470	3510	3550
5	3150	3210	3300	3310	3350	3390	3400

Tab. 5 Gewicht der Kaninchen in g

Veränderungen am Autopsiematerial.

Es fand sich bei allen Tieren eine schwach vergrößerte, weiche Leber, die eine relativ helle Farbe aufwies.

Mikroskopisch (Abb. 7) zeigte sich das typische Bild der trüben

Schwellung, abwechselnd mit vakuolisierten Epithelzellen. In den periportalen Feldern fanden sich Zellen, die mit einem feinkörnigen, gelbbraunen Pigment beladen waren.

In der Lunge zeigten sich Fett-Tröpfchen in dem Gefäßsystem der Alveolarsepten. Sie lagen zwischen zusammengeballten Erythrozyten.

Auch im Herzmuskel fanden sich vereinzelt Fett-Tröpfchen.

In der Niere zeigte sich wie in der Leber das Bild der trüben Schwellung (Abb. 8), wolkige Auflockerungen der Tubulusepithelien mit vereinzelten Vakuolenbildungen und sternförmig eingeengtem Tubuluslumen.

Die Milz war wie die Leber bei allen Tieren leicht vergrößert. Mikroskopisch fand man Retikulumzellen, die Hämosiderinkörnchen enthielten (Abb. 9).

Am Darm, Nebennieren und quergestreifter Muskulatur waren morphologisch keine Veränderungen faßbar.

Diskussion.

Die vorliegenden Untersuchungsergebnisse über das Verhalten der Serumlipide, der Serumeiweißkörper, der histologisch faßbaren Organveränderungen und der allgemein-klinischen Befunde, wie Blutbild und körperliche Verfassung von Versuchstieren (Kaninchen), die über einen längeren Zeitraum (24 Wochen) ein hochwirksames Netzmittel appliziert bekamen, veranschaulichen die Wirkungsweise bzw. die Folgen einer Dauerlipämie.

Wie zu erwarten (2,5,8,9,11,13,14,17,24,25,28,33,35,36,37,39), kam es zunächst bereits nach erster Injektion und von da an über die gesamte Beobachtungszeit zu einer Hyperlipämie, die durch einen kontinuierlichen Anstieg des Gesamtfettes, des freien und Gesamt-Cholesterins sowie der Phosphatide bedingt und wenigstens in den ersten Kontrollen durch eine Vermehrung der im beta-Glob.-Bereich wandernden Serumlipide- und zwar sowohl des Proteinanteils dieser Lipoproteide als auch der an diese Fraktion gebundenen Fettkomponenten - ausgezeichnet war. Auf Grund der Lipoid-elektrophorese ist allerdings der Fettanteil weitaus größer als die Zunahme des Trägerproteins, d. h. es besteht wahrscheinlich

bei dieser Trägerfraktion eine außerordentlich hohe Bindungskapazität für Fette.

Während also unter einer fortlaufenden Applikation des Netzmittels die Serumlipide insgesamt anstiegen, fand sich, bezogen auf das Gesamt-Cholesterin, ein kontinuierlicher Cholesterinestersturz, was im übrigen auch Kellner (24,25), der mit derselben Tierspezies arbeitete, beobachtet hat. Diese Beobachtungstatsache legt den Schluß nahe, daß in Analogie zu den Befunden bei schweren Leberparenchymschädigungen eine primäre Lipoidanreicherung mit diskrepantem Cholesterinesterwert entweder als Ausgangslage für eine in Entstehung begriffene Leberparenchymschädigung oder aber als Begleitsymptom einer Leberparenchymschädigung aufzufassen ist. Dadurch, daß bei unseren Versuchen die Lberfunktionsteste nicht pathologisch verändert waren, ist es jedoch möglich, daß unter der Einwirkung des Netzmittels lediglich ein relatives Überwiegen des freien Cholesterins entstanden ist.

Eine klare Vorstellung über die Freisetzung bzw. Aktivierung von Fettstoffen unter dem Einfluß von hochaktiven Netzmitteln besteht auch heute, trotz mehrfacher Studien unter verschiedenen Gesichtspunkten und Versuchsanordnungen, noch nicht. Es sei in diesem Zusammenhang auf die einschlägigen Mitteilungen der Literatur verwiesen (2,11,12,13,14,18,24,33,35,36,37,38,40) und zusammenfassend zu diesem Problem nur folgendes erwähnt: Netzmittel scheinen in erster Linie die Zellpermeabilität um ein Vielfaches zu erhöhen, wodurch - und das gilt vor allem für fettspeichernde Zellen und Organe - offenbar zelleigene Lipide liberiert und in die Blutbahn abtransportiert werden, woselbst sich diese Lipide anreichern. Für diese Hypothese spricht u. a. die Tatsache, daß im Tierexperiment neben den Lipiden u. a. auch Proteine, insbesondere Glykoproteide im Blutstrom vermehrt angetroffen werden, was u. U. auf eine Mitfreisetzung solcher Proteide aus den durch das Netzmittel geschädigten Zellen zurückzuführen ist. Ob allein die Hypothese einer Permeabilitätserhöhung ausreicht, um die Hyperlipämie zu erklären, ist fraglich, zumal Ausmaß und Dauer solcher Hyperlipämien - auch dann, wenn man die oft recht unterschiedlichen Dosen sowie die ebenfalls verschiedenen Beobachtungszeiten der in der Literatur mitgeteilten Arbeiten berücksichtigt - augenscheinlich in keinem Ver-

hältnis zu der gesetzten Zelläsion stehen.

Die Hyperlipämie, die z. B. durch eine einmalige Applikation eines Netzmittels ausgelöst werden kann, nimmt in Stunden kontinuierlich zu, um selbst nach Tagen nicht wieder auf physiologische Werte zurückzukehren (11,24,35). Es wurde aus diesem Grunde u. a. die Aktivierung einer Fettsynthese unter dem Einfluß von Netzmitteln diskutiert. Die vorliegenden Untersuchungsergebnisse, bei welchen in größeren Abständen die einzelnen Kontrollen vorgenommen wurden, lassen zu dieser Frage keine Stellungnahme zu, da in dieser Versuchsreihe kontinuierlich neue Reize gesetzt wurden. Es wäre hier allerdings denkbar, daß die Fettdepots längst erschöpft sein könnten, und daß bei gegebenem fortlaufenden Anstieg der Lipide an einer Neubildung von Fetten (bei ausschließlich pflanzlicher Ernährung) fast nicht zu zweifeln ist.

Auf Grund des Verhaltens des Gesamt-Eiweißes und der Serumelektrophorese (Proteinfärbung) konnte keine tiefgreifende Veränderung der Serumproteine aufgezeigt werden, insbesondere war keine Verminderung des Albumins faßbar, wie dies von anderer Seite (2,5,35,36) bei allerdings etwas unterschiedlicher Versuchsanordnung und anderer Tierspezies beobachtet wurde. Möglicherweise spielen bei jenen Befunden versuchsbedingte Entblutungen (gehäufte Blutentnahmen) eine maßgebliche Rolle für die Entstehung einer Hypalbuminämie. Die lediglich für die beta-Globuline beobachtete kontinuierliche Zunahme der Proteine und Lipoproteide war zwar bis zu einem gewissen Grade auffällig jedoch nicht significant, d. h. die Einzelwerte bewegten sich noch immer im Rahmen der für Kaninchen als normal anzusehenden Bereiche. Möglicherweise sind diese nur wenig imponierenden Serumproteinveränderungen auf die von uns gewählte - relativ zu den entsprechenden in der Literatur bekannten Daten - niedrige Dosis des Netzmittels zurückzuführen. In Diskrepanz hierzu steht die Tatsache, daß im Verlaufe der Beobachtungszeit der vorliegenden Versuchsreihe die Glykoproteide des Serums offenbar einen tiefgreifenden Wandel erfahren haben. Es kam dabei zu einer Verschiebung in Richtung der beta-Globuline. Die Anreicherung von Glykoproteiden im Serum bei Anwendung von Netzmitteln deckt sich prinzipiell mit den Befunden auch anderer Autoren (35,36). Dort wird allerdings nicht sicher

entschieden, ob es sich um die Anreicherung von beta- oder gamma-Globulinen handelt, während auf Grund der vorliegenden Untersuchungsergebnisse einwandfrei die Glykoproteidvermehrung in den beta-Globulinbereich fällt, also jenen Proteinen zuzuordnen ist, welche zugleich als hauptsächliche Trägereiweiße für Fette fungieren (7,32). Diese kleine Diskrepanz mag durch die Tatsache, daß bei stark vermehrten Proteinen eine exakte Differenzierung mit der Papierelektrophorese nicht leicht möglich ist, bedingt sein.

Die Feststellung, daß in vorliegender Versuchsreihe die mitgeprüften Serumlabilitätsteste und der Rest-N praktisch keine Veränderungen aufzeigten, sagt aus, daß 1. keine tiefgreifenden eiweiß-katabolen Vorgänge stattgefunden haben - das deckt sich mit der Tatsache, daß auch keine Dysproteinämie vorlag: die Verschiebungen im Lipoid- und KH-Haushalt scheinen an nur geringe Veränderungen der zugrundeliegenden Trägerfraktion gebunden zu sein - und daß 2. noch keine erheblichen Funktionsstörungen etwa der Leber oder der Niere vorgelegen haben dürften, die sich in irgendeiner Weise auf die Teste ausgewirkt hätten.

Die Beobachtungstatsache, daß in unmittelbarem Anschluß an die Netzmittelinjektionen Hämolyse auftrat, entspricht den Erfahrungsberichten (10,19,20,21,22,23,26,27,29,30), daß schlechthin bei jeder hochgradigen Lipämie hämolytische Begleitphänomene faßbar werden. Die auch in den vorliegenden Ergebnissen festgestellten Hämosiderinablagerungen in Leber und Milz und wahrscheinlich auch der wahrgenommene Juckreiz bei den Versuchstieren sprechen dafür, daß eine vermehrte Erythrozytenmauserung erfolgt ist. Ob bei den Tritonversuchen das Netzmittel als solches eine Schädigung an den Erythrozyten gesetzt hat, oder ob die Anreicherung von Lipiden im Serum - gleichviel, welche Ursache - infolge physikalischer Umsetzungen eine wenigstens teilweise Hämolyse der Erythrozyten bedingt hat, kann insoweit entschieden werden, als beide für sich jeweils eine Hämolyse hervorrufen können, und daß im vorliegenden Fall unter Umständen eine Summationswirkung anzunehmen ist. Darüberhinaus wurde auch im vorliegenden Versuch das bei Hyperlipämien häufig beschriebene Blood-Sludge-Phänomen, d. h. eine stärkere Zusammenlagerung von Erythrozyten in Gestalt

von Geldrollen oder auch von locker gebundenen Konglomeraten beobachtet. In Diskrepanz zu der Hämolyse wurde hier lediglich bei zwei Tieren ein relativer Abfall der Erythrozytenzahl festgestellt, wobei jedoch, gemessen an den Mittelwerten, eine Significanz nicht faßbar wurde. Im übrigen konnte eine bleibende Anämie bei den Versuchstieren nicht beobachtet werden.

Inwieweit der zweifellos eindrucksvollen Leukozytose als Begleitsymptom eines etwa unspezifischen Entzündungsprozesses oder als Ausdruck einer allgemeinen Zellstoffwechselstörung Bedeutung zukommt, ist in Zusammenhang mit den vorliegenden Befunden außerordentlich schwer zu entscheiden, zumal typische Zeichen einer Entzündungsreaktion weder aus dem Differentialblutbild, noch aus den Serumlabilitätsproben, noch aus den histo-pathologischen Veränderungen der Organe abzuleiten sind. Außerdem finden sich in der Literatur über ein derartiges Symptom der Hyperleukozytose leider keine entsprechenden Untersuchungsergebnisse. Es wäre allenfalls die Leukozytose auf eine bei fast allen Kaninchen beobachtete mehr oder weniger lokalbegrenzte Phlebitis im Gebiet der jeweiligen Injektionsstellen oder auf aufgepfropfte Spontaninfekte zurückzuführen.

Die vorliegenden autoptischen Befunde der in Versuch gestandenen Kaninchen entsprechen den morphologischen Ergebnissen von Kellne (24,25). Es handelt sich hierbei im wesentlichen um gewebliche Veränderungen vom Typ der trüben Schwellung und somit relativ geringfügigen Veränderungen an den verschiedenen Organen. Frühere Beobachtungen an Rattenorganen (35) mit den Zeichen einer großtropfigen Organverfettung und sogar einzelnen Zellnekrosen sind demnach auf die weitaus höheren Dosen des Netzmittels zurückzuführen, wobei sicher die Vorstellung zutrifft, daß das injezierte Netzmittel als Toxin wirksam war. Die Möglichkeit, daß die durch Triton verursachte Hyperlipämie zu einer erhöhten Ablagerung von Fettsubstanzen in den Organen geführt und bereits Nekrosen nach sich gezogen hat, erscheint deshalb nicht überzeugend, weil erstens die Zeit der Entwicklung dieser Zellschädigungen auffallend kurz (Stunden) war und weil zweitens die Phosphatide, die bekanntlich auch hier stark mit angestiegen sind, gerade degenerativen Prozessen Einhalt gebieten sollen (1,3,4,15,25,31,34,38). Zumindest ist den ent-

sprechenden Literaturangaben zu entnehmen, daß hauptsächlich die Phosphatide einen bedeutenden Stabilisierungseffekt auf Fettemulsionen im hyperlipämischen Blut haben und außerdem den Transport von Neutralfetten anregen, so daß es praktisch zu keinen langdauernden Fettablagerungen in den parenchymatösen Zellen kommen kann. Somit wird auch die Entwicklung etwa einer Fettcirrhose oder einer Atheromatose (6,15,24,25) verhindert oder wenigstens erschwert.

Das in den Nierentubuli beobachtete Phänomen der trüben Schwellung mit vereinzelten Fettvakuolen kann allein auf Rückresorptionsvorgänge der von den Glomeruli ausgeschiedenen Fett- und Eiweißstoffe bezogen werden und muß infolgedessen nicht Ausdruck einer beginnenden primären Tubulusschädigung sein. Demnach wäre abzuleiten, daß auch das Problem der Nephrose in Beziehung gesetzt werden kann mit allgemeinen Stoffwechselstörungen des Fett- und Eiweißhaushaltes. Gemessen an den hier vorliegenden Befunden und Beobachtungen während der Versuche, kann eine sich anbahnende Nephrose weitgehend ausgeschlossen werden. Somit scheinen in einem primär gesunden Organismus die Kompensationsprinzipien bei einem Überangebot von zirkulierenden Fetten zur Verhütung tiefgreifender Organläsionen in hohem Maße wirksam zu sein, selbst dann, wenn eine Hyperlipämie relativ hoch und lange existent ist.

Zusammenfassung.

Die Befunde zeigen insgesamt, daß unter dem Einfluß von Netzmitteln, offenbar auf dem Boden einer Permeabilitätssteigerung der Zellgrenzflächen, eine deutliche Einschwemmung von Lipiden in die Blutbahn ausgelöst wird, und daß die erzeugte Hyperlipämie auch bei längerem Bestehen offenbar keine erheblichen Läsionen an den verschiedenen Organen zu setzen vermag.

Bei der Freisetzung von Lipiden aus dem Protoplasma wurden auch KH und Proteine frei, Lipide und KH in Relation zu den Eiweißen jedoch in unverhältnismäßig höherem Grade.

Literatur.

(1). Ahrens, E.H.,Jr. u. Kunkel, H.G. J. Exp.Med. 90,409 (1949)
The stabilization of serum lipid emulsions by serum phospholipids.

(2). Berg, G.u.Schön, H. Arzneim.Forsch. 7,307 (1957)
Das Verhalten der Serumlipide und Serumproteine nach Einverleibung eines Netzmittels. I.Mitt.

(3). Bollmann, J.L.u.Flock, E.V. Am.J.Path. 17,439 (1941)
Blood phospholipid changes in experimental cholesterol arteriosclerosis.

(4). Büchner, F. Spezielle Pathologie Urban u. Schwarzenberg München-Berlin 282 (1956)

(5). Byers, S.O.u.Friedman, M.J. Clin.Investig. 35,522 (1956)
The causal role of plasma albumin deficiency in experimental nephrotic hyperlipemia and hypercholesteremia.

(6). Chaikoff, I.L., Lindsay,S., Lorenz, F.W.u.Entenmann, C. J.Exp.Med. 88,373 (1948) Production of atheromatosis in the aorta of the bird by administration of diethylstilbestrol.

(7). Cohn,E.J.,Strong,L.E.,Hughes,W.L.,Jr.,Mulford,D.J.,Ashworth J.N.,Melin,M.u.Taylor,H.L. J.Am.Chem.Soc.68,459 (1946)
Preparation and properties of serum and plasma proteins. IV.A. system for the separation into fractions of the protein and lipoprotein components of biological tissues and fluids.

(8). Cornforth,J.W.,Hart, P.D.A.,Rees,R.J.W.u.Stock,J.A. Nature 168,150 (1951) Antituberculous offect of certain surface-active polyoxyethylene ethers in mice.

(9). Dubos,R.J.u.Middlebrook,G.J. Exp.Med. 88,81 (1948)
The effect of wetting agents on the growth of tubercle bacilli.

(10).Dunham,L.J.u.Brunschwig,A. Arch.Surg. 48,395 (1944)
Intravenous administration of fat for nutritional purposes.

(11).Frantz, J.D.,Jr.u.Hinkelmann,B.T. Fed.Proc. 13,211 (1954)
Effect of Triton WR-1339 on cholesterol synthesis in the rat.

(12).French,J.E.u.Morries,B.J.Physiol. 138,326 (1957)
The removal of ^{14}C-labelled chylomicron fat from the circulation in rats.

(13).Friedman,B.u.Byers,S.O.J.Exp.Med. 97,117 (1953)
The mechanism responsible for the hypercholesteremia induced by triton WR-1339.

(14).Garattini,S.,C.Morpurgo, and N. Passerini Experientia 12,347 (1956) Diphenylilethylacetic acid inhibits hypercholesteremia induced by Triton.

(15).Gertler,M.M.,Garn,M.S.u.Lerman,J.Circulation 2,205 (1950)
The interrelationships of serum cholesterol, cholesterol esters and phospholipids in health and in coronary artery disease.

(16).Henning,N.u.Mitarbeiter Klinische Laboratoriumsdiagnostik Urban u. Schwarzenberg München-Berlin, 11,16,21,67,81,84,85 144,409 (1960)

(17).Hirsch,R.L.u.Kellner, A.J.Exp.Med. 104,1 (1956)
The pathogenesis of hyperlipemia induced by means of surface-active agents. I.Increased total body cholesterol in mice given Triton WR-1339 parenterally.

(18).Hirsch.R.L.u.Kellner, A.J. Exp.Med. 104,15 (1956)
II. Failure of exchange of cholesterol between the plasma and the liver in rabbits given Triton WR-1339.

(19). Johnson,V., and Freeman,W., Am.J.Physiol. 124,466 (1938)
The adaptive value of absorption of fats into the lymphatics.

(20).Freeman,W.,and Johnson,V. Am.J.Physiol. 130,723 (1940)
The hemolytic action of chyle.

(21).Joan Lognini,Freeman,W.,and Johnson,V. Federation proc.1,51 (1942) Increased red blood cell fragility during lipemia.

(22).Johnson,V.,Lognini,J.,and Freeman,W., Science 97,400 (1943)
Destruction of red blood cells after fat ingestion.

(23).Josephs.H.W.,L.Emmett Holt,Jr.Herbert C. Tridwell and Charlotte N. Kajdi., J.Clin.Investig. 17,532 (1938)
The influence of fat upon the excretion of urobilin.

(24).Kellner,A.,Corell,J.W.,and Ladd, A.T., J.Exp.Med.93,373 (1951)
Sustained hyperlipemia induced in rabbits by means of intravenously injekted surface-active agents.

(25).Kellner,A.Correl,J.W.u.Ladd,A.T. J.Exp.Med. 93,385 (1951)
The influence of intravenously administered surface-active agents on thedevelopment of experimental atherosclerosis in rabbits.

(26).Kibbin,Mac.J.M.,Ph.D.,A.Pope,M.D.,S.Thayer,B.A., R.M.Ferry,Jr.and F.J.Stare, Ph.D.,M.D., J.Lab.a.Clin.Med. 30,488 (1945) Studies of fat emulsions for intravenous alimentation.

(27).Kibbin,Mac.J.M. J.Clin.Investig. 25,679 (1946)
The utilization of emulsified fat given intravenously.

(28).Kato,L.u.Gossy,B. Am.Rev.Tuberc.A.Pulm.Dis. 75,684 (1957)
Experiments on the mechanism of action of Triton A-20 and 1,4-dimethyl-7-isopropyl-bicyclo-decapentane.

(29).Meng.H.G. Master's Thesis, Northwestern University Medical School (1946) Parenteral alimentation of carbohydrate and fat.

(30).Meng.H.C.u.Freeman,S.J. Lab.a.Clin.Med.33,689 (1948)
Experimental studies on the intravenous injektion of a fat emulsion into dogs.

(31).Meyer,W.W. Klin. Wschr. 30,244 (1952)
Die Eiweißablagerungen im Werdegang der Arteriosklerose.

(32).Oncley,J.L.,Gurd,F.R.N.u.Melin,M. J.Am.Chem.Soc.72,458 (1950)
Preparation and properties of serum and plasma proteins. XXV.Composition and properties of human serum beta-lipoprotein

(33).Patnode,R.A.,Hudgins,P.C.u.Janicki,B.W. J.Exp.Med. 107,33 (1958) Studies on the effect of Triton (WR-1339) on guinea pig tissues.

(34).Schettler,G.Dtsch.Med.Wschr. 78,989 (1953)
Arteriosklerose und Cholesterinstoffwechsel unter besonderer Berücksichtigung der Diätfrage.

(35).Schön,H.,Berg,G.u.Gmählich,M, Arzneim.Forsch. 8,768 (1958)
Das Verhalten der Serumlipide und Serumproteine nach Einverleibung eines Netzmittels.II.Mitt.

(36).Schön,H.u.Berg.G. Blut 5,297 (1959)
Das Verhalten der Proteine und proteingebundenen Kohlenhydrate im Serum nach Verabreichung eines Netzmittels (Beitrag zur Entstehung hyperproteinämischer Dysproteinämien.)

(37).Schotz,M.C.Scann.A.u.Page,I.H. Am.J.Physiol. 188,399 (1957)
Effect of Triton on lipoprotein lipase of rat plasma.

(38).Sherber,D.A.u.Levites,M.M. J.A.M.A. 152,682 (1953)
Hypercholesteremia effect on cholesterol metabolism of a polysorbate 80-choline-inositol complex (monichol).

(39).Solotorovsky,M.u.Gregory,F. J.Am.Rev.Tuberc. 65,718 (1952)
Antituberculous activity inmice of Triton A-20, a non ionic alkyl-arylpolyether alcohol, uced alone and in combination with dihydrostreptomycin.

(40).Zilversmit,D.B.,Entenmann,C.u.Chaikoff,I.L. J.Biol.Chem. 176,209 (1948) The turnover rates of plasma lecithin and plasma sphingomyelin as measured by the disappearence of their radioactive phosphorus from the circulation.

Es ist mir ein herzliches Bedürfnis,
Herrn Professor Dr. N. Henning für die Übernahme des Referates ergebendst zu danken.

Herrn Professor Dr. F. Scheiffarth gilt darüberhinaus mein ganz besonderer Dank für die Stellung des Themas und die allzeit freundliche Beratung.

Nicht zuletzt sei Fräulein Dr. H. Götz freundlich gedankt für ihre Unterstützung bei den experimentellen Untersuchungen.

Erlangen, den 5. 11. 1962

Wolfgang Schulze

Lebenslauf

Am 28. März 1935 wurde ich, Wolfgang Schulze, als Sohn des Ober-Ing. Ernst Schulze und seiner Ehefrau Herta in Berlin geboren, wo ich auch meine Kindheit und einen großen Teil meiner Schulzeit verlebte. 1952 verlegten meine Eltern unseren Wohnsitz nach Stuttgart; dort legte ich 1955 das Abitur ab.

Ich studierte Medizin in Tübingen und Erlangen. Während der Semesterferien arbeitete ich an verschiedenen Krankenhäusern.

Seit dem Abschluß meines Studiums mit dem Staatsexamen im August 1961 war ich als Medizinalassistent über 1 Jahr an verschiedenen Abteilungen der Med.Univ.Klinik (Dir.: Prof. Dr. N. Henning) und zuletzt bei einem Praktiker in Donauwörth tätig.

Ich bin nach Erlangen zurückgekehrt, um mich hier der Promotionsprüfung zu unterziehen.

Erlangen, den 5. 11. 1962